

S55
? t 55/9 1 PN=JP 2287145

55/9/1
DIALOG(R)File 347:JAPIO
(c) 1998 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

03311645
METHOD FOR FIXING SMALL-DIAMETER PIPE WHERE RECEPTOR IS FIXED AND RECEPTOR

PUB. NO.: 02-287145 [JP 2287145 A]
PUBLISHED: November 27, 1990 (19901127)
INVENTOR(s): TSURUTA HITOSHI
YAMADA HIDEAKI
NAKAMURA MICHIIHIRO
APPLICANT(s): KURARAY CO LTD [000108] (A Japanese Company or Corporation),
JP (Japan)
APPL. NO.: 01-109997 [JP 89109997]
FILED: April 27, 1989 (19890427)
INTL CLASS: [5] G01N-027/28; G01N-027/416; G01N-033/543
JAPIO CLASS: 46.2 (INSTRUMENTATION -- Testing); 28.2 (SANITATION --
Medical)
JAPIO KEYWORD: R125 (CHEMISTRY -- Polycarbonate Resins)
JOURNAL: Section: P, Section No. 1165, Vol. 15, No. 59, Pg. 30,
February 13, 1991 (19910213)

ABSTRACT

PURPOSE: To obtain the small-diameter pipe which can be mass-produced and is small in receptor use quantity and where inexpensive receptors are fixed by fixing a 1st receptor which is coupled singularly with an analyte on the internal wall of the small-diameter part of the small-diameter pipe.

CONSTITUTION: The 1st receptor which is coupled singularly with the analyte as a material to be measured is fixed on the internal wall of the small-diameter pipe part 2 of the small-diameter pipe 1 in a pipette chip shape which increases in diameter from the thin-diameter part 2 for pH electrode insertion provided atop to the rear end. Further, small-diameter pipes 1a - 1d are coupled in series by the fixing method for receptors and a suction means is connected to the rear end opening of the small-diameter pipe 1a of the final part; and a buffer solution obtained by dissolving the 1st receptor coupled singularly with the analyte to be measured is sucked by the suction means from the tip of the small-diameter part of the small-diameter pipe at the tip part and thus the 1st receptor is fixed on the internal wall of at least the small-diameter pipe part of each small-diameter pipe. Consequently, homogeneous small-diameter pipes can be manufactured in quantities at a time. Further, the small-diameter pipes become inexpensive because of the use quantity of receptors is small.

BEST AVAILABLE COPY

⑫ 公開特許公報(A)

平2-287145

⑤ Int. Cl.⁵G 01 N 27/28
27/416
33/543

識別記号

3 0 1 Z

庁内整理番号

7363-2G

P

7906-2G

7363-2G

④ 公開 平成2年(1990)11月27日

G 01 N 27/46

3 8 6 Z

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

④ 発明の名称 レセプタが固定された細径管およびレセプタの固定方法

② 特 願 平1-109997

② 出 願 平1(1989)4月27日

⑦ 発 明 者 鶴 田 仁 志 岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社クラレ内
 ⑦ 発 明 者 山 田 秀 明 岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社クラレ内
 ⑦ 発 明 者 中 村 通 宏 岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社クラレ内
 ⑦ 出 願 人 株 式 会 社 ク ラ レ 岡山県倉敷市酒津1621番地
 ⑦ 代 理 人 弁 理 士 本 多 堅

明 細 考

1. 発明の名称

レセプタが固定された細径管
 およびレセプタの固定方法

2. 特許請求の範囲

1. 先端に設けられたpH電極挿入用の細径部から後端に向って広径するビベットチップ形状の細径管の少くとも細径部内壁に、測定対象物質たるアナライトと特異的に結合する第1のレセプタが固定されてなることを特徴とするレセプタが固定された細径管。

2. 請求項1記載の複数の細径管を直列に連結して、最後部の細径管の後端開口に吸引手段を接続するとともに、該吸引手段によって先端部の細径管の細径部先端から測定対象物質たるアナライトと特異的に結合する第1のレセプタを溶解させた緩衝溶液を吸引することにより、各細径管の少くとも細径部内壁に第1のレセプタを固定することを特徴とするレセプタの固定方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は微量アナライト物質の測定、特に免疫反応(抗原-抗体反応)を利用して生体試料のような多成分系に微量含まれる特定の物質を定量的に測定するために用いられる、レセプタが固定された細径管およびレセプタの固定方法に関するものである。

(従来技術)

生体の生理活性に関与する物質は概して微量であり、しかも生体に対して非常に重要な役割を演じるものが少なくない。したがって、このような微量の生理活性物質を定量的に測定することは医学、生化学等の生物関連分野にとって重要であり、そのための種々の方法が考案され、実用化されている。そのうち酵素、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質などを標識として用いるアナライト-レセプタ方式の測定が従来より広く普及している。アナライト-レセプタ方式の測定においてはまず測定対象物質たるアナライトと特異的に結

合し得る第1のレセプタを固定化した固相を試料溶液と標識第2レセプタ、もしくは標識アナライト(以下これらの標識体をコンジュゲートという)と同時、または逐次的に接触させてアナライト-レセプタ反応を行なわせた後、洗浄し、しかる後に該固相上に残存している標識物質の量を測定することによって試料溶液中のアナライトの量を測定するのである。ここで標識としてはラジオアイソトープや酵素等の増感作用の大きい物質が用いられる。またレセプタとしてはアナライト、抗原やハプテンのときはそれに対する特異抗体、あるいはアナライトが抗体である時はその抗体に対する抗原性物質、アナライトがDNAやRNAである時にはそれらに相補的なDNAやRNA、アナライトがリガンドである時にはそれに対するレセプタがそれぞれ用いられる。かかる測定方法の代表例として不均一法EIA、いわゆるEnzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)が知られている。

ELISAにおいては、試料溶液中の測定対象

基質溶液の光学的性質の変化を観察するには、従来からいくつかの方法が用いられている。そのうち機器を用いる方法としては、吸光光度計、蛍光光度計、化学発光光度計などで基質溶液の光学的性質の変化を光学的に測定するものがある(例えば、石川、河合、宮井、酵素免疫測定法、医学書院(1982)参照)。

また、別の方法として基質溶液と対照基質溶液を対比させ基質溶液の色の違いを肉眼で観察して微量アナライト物質の存在を判定するものがある。

しかしながら機器を用いたこれらの光学的測定系は通常安定な光源、高感度の光度計、精密な光学系増幅回路等を要するために、高価で、大がかりで複雑な装置にならざるを得なかった。また測定するに当り、特殊な技術を必要とするため取扱いのための専門の技術者を配置しなければならなかった。

一方肉眼で直接観察する方法は、定性的な測定方法であり、色の変化のバラツキや観察者の主観が入るので判定に個人差が生じやすい。さらに、

物質を捕捉するために、測定対象アナライトと特異的に結合し得るレセプタを試験管、マイクロプレート等に固定化した固相が用いられ、増感用の標識として酵素が用いられる。例えば測定対象アナライトが抗原の場合、サンドイッチ法ELISAにおいては該抗原に結合し得る第2抗体(第2レセプタ)に酵素を標識する。また競合法ELISAにおいては測定対象抗原と同一の抗原に酵素を標識する。一方測定対象アナライトが抗体であり、これを抗原サンドイッチ法で測定する場合には、レセプタとして抗原が用いられ、さらに酵素標識した抗原が第2レセプタとして用いられる。また競合法によって抗体(アナライト)を測定する場合には、レセプタとして抗原を用い、該抗原に対して測定対象抗体と競合し得る抗体を選択しこれに酵素が標識される。上記標識として用いられた酵素に対する基質溶液と、そしてさらに必要ならば発色試薬を固相と接触させる。すると基質溶液の分解反応に伴う基質溶液の光学的性質が変化するので、その変化を観察するのである。

極く微量の物質の測定の場合には色の変化が少なく判定が困難であった。

本発明者らは従来の測定方法の欠点を解消し、観察者の主観による判定基準の曖昧さを除去して、基質溶液の分解反応を客観的に、しかも高い検出精度で測定する操作の簡単な微量アナライト物質の測定装置の特願昭63-38274号に提案した。

かかる装置は第4図に示すように、基質溶液の入口12と出口13を有するセル11と、該セル11内に収容されたpH電極14(通常pH感応電界効果トランジスタが用いられる)及び比較電極15と、セル内に基質溶液を供給するポンプ20と、内表面にレセプタを固定した細径管1をセル11内に収納する手段9で構成されている。

上記装置の基本的な操作は、まず内壁にレセプタを固定化した細径管1を準備する。次に該細径管をアナライト溶液およびコンジュゲート溶液と反応させ、内壁にアナライト-レセプタ複合体(コンジュゲートを含む)を形成させる。その後細径管を洗浄して遊離のアナライトや遊離のコン

シユゲートを除去する。次に細径管をセル内に収容する手段9により、第5図に示すように細径管1がpH電極14のpH感応面16を包囲するようにセル内に収容する。そのとき細径管1の内壁とpH電極14のpH感応面16の間隙が1mm以下に設定することが重要である。この前もしくは後に少くともこの間隙に基質溶液を導入して、細径管の内壁に吸着したコンジュゲートによつて基質溶液を分解し、この時の基質溶液のpH変化をpH電極14で測定する。

かかる装置は従来の光学的検出器を用いて微量なアナライト物質を検出する方法に比べて、装置が簡易で、また細径管の先端部内壁を固相とするために、洗浄が容易で、かつ免疫反応時間および酵素反応時間が短くても測定が可能であるという優れた利点を有している。

(発明が解決しようとする課題)

上記測定法において、一定の品質を有する固相用の細径管を量産することは、再現性の良好な測定結果を得るために極めて重要である。また細径管の先端部内壁に固定されるレセプタは高価であ

固定する方法である。

第1図は本発明の細径管1の断面図であり、該細径管は先端にpH電極を挿入する細管部2と、拡張部3及び後端に設けられたヘッド4で構成されている。拡張部3はさらにセルに設けられたテーバに沿つて細径管の先端細管部2をpH電極に確実に包囲させるためのガイドとしての第1の拡張部aと、後述する複数の細径管を直列に連結するための第2の拡張部b及び吸引手段(図示せず)の先端に設けられたテーバが嵌設される第3の拡張部cを有している。細径管1の先端細管部2はその中に挿入されるpH電極の外径もしくは幅より若干太めに設計される。例えばpH電極の幅が450 μ mであれば通常内径500~600 μ mが適当である。また細管部の長さは、通常挿入されるpH電極の長さの2~10倍が適当である。例えばpH電極としてpH感応電界効果トランジスタを使用すると、その長さが通常1.5mmであるので細管部2の長さは3~15mm程度が好ましい。細径管1の有効内容積は細管部2、第1の拡張部a及び第2の拡張部bの内容積の和に

るので、そのコストを少なくすることも重要である。したがつて、本発明の目的は上記装置に適用可能な、レセプタが固定された細径管を提供することである。さらに本発明の目的は上記二つの条件を満たしながら細径管の先端部内壁に抗原や抗体などのレセプタを固定する方法を提供することである。

(課題を解決するための手段)

すなわち、本発明の細径管は先端に設けられたpH電極挿入用の細管部から後端に向つて拡張するビベツトチップ形状の細径管の少くとも細管部内壁に、測定対象物質たるアナライトと特異的に結合する第1のレセプタが固定された細径管である。

さらに本発明の製造方法は複数の上記細径管を直列に連結して、最後部の細径管の後端開口に吸引手段を接続するとともに、該吸引手段によつて先端部の細径管の細管部先端から測定対象物質たるアナライトと特異的に結合する第1のレセプタを溶解させた緩衝溶液を吸引することにより、各細径管の少くとも細管部内壁に第1のレセプタを

等しい。したがつて所望する容積に応じて第1の拡張部a及び第2の拡張部bの内径と長さが設計される。第3の拡張部cの内径およびテーバは吸引手段(通常ビベツタ、シリンジなどが使用される)の外径とテーバに対応して設計される。第2の拡張部bの内壁テーバと外壁テーバは複数の細径管を直列に連結したときに液密に接合するようにその勾配を部分的もしくは全体的に一致させる必要であるが、例えば第3の拡張部cの内壁と第2の拡張部bの外壁の一部、あるいは細管部2の内壁もしくは第1の拡張部aの外壁を接合させても2つの細径管を液密に連結できる。

細径管の材質としては、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリテトラフロロエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルアルコール、エチレン-ビニルアルコール共重合体等のポリオレフィン系ポリマー、ポリエチレンテレフタレートやポリブチレンテレフタレート等のポリエステル系ポリマー、ポリジメチルシロキサン等のポリシロキサン系ポ

リマー、6ナイロン、6.6-ナイロン等のポリアミド系ポリマー、ポリカーボネート、酢酸セルロースやニトロセルロースのようなセルロース系ポリマー、さらには各種無機ガラスを用いることができる。

上記細径管1の少くとも先端細管部2の内壁に測定対象物質たるアナライトと特異的に結合する第1のレセプタ5が固定されている。細管部2の内壁は第2図に示すように多数の凹凸を設けて表面積を大きくすると検出感度を向上させたり、インキュベーション時間を短縮することができて好ましい。

なお、このような細径管にレセプタを固定化し、微量物質の検出に利用することができると考えられる物質と、それらにより測定できると考えられる項目の一例を表-1に示す。

細径管に固定する物質	測定項目
抗AFP抗体	AFP
抗CEA抗体	CEA
抗フェリチン抗体	フェリチン
抗 β_2 ミクログロブリン抗体	β_2 ミクログロブリン
抗IgE抗体	IgE
抗TSH抗体	TSH
抗HCG抗体	HCG
抗インシュリン抗体	インシュリン
抗HBs抗体	HBs抗原
抗HBe抗体	HBe抗原
HBs抗原	抗HBs抗体
抗C ₁ q抗体	免疫複合体
dsDNA	抗dsDNA
インシュリンレセプタ	インシュリン
DNA	相補的DNA

次に細径管1の少くとも先端細管部2の内壁にレセプタを固定する方法について説明する。まず複数、例えば4ケの細径管1(a)、1(b)、1(c)、1(d)を用意して、細径管1(a)の後端開口から順次細径管1(b)、1(c)、1(d)の先端を挿入して第3図に示

すように直列に連結する。この場合細径管に設けられた第2の拡張部の外壁と、隣接する細径管に設けられた第2の拡張部の内壁が液密に接合されるように細径管を隣接する細径管の内腔へ嵌挿する。

次いで細径管1(d)の端部開口からピペットのヘッド6を液密に嵌挿する。そして細径管1(a)の先端細管部2を測定対象物質たるアナライトと特異的に結合する第1のレセプタを溶解させた緩衝溶液7中に入れ、ピペットで所望容積の緩衝溶液を各細径管内に吸引する。この時吸引する溶液の容積Vは、第1図に示す細管部2と第1の拡張部aの内部の容積をv、直列に連結された細径管の数をnとすると、 $V = nv$ であらわされる。この状態で所定時間静置後、細径管内の緩衝溶液を排出することによりアナライトと特異的に結合する第1のレセプタ（例えば抗原、抗体など）が細径管1の先端細管部2及び第1の拡張部a内壁に物理吸着もしくは化学結合により固定される。化学結合により固定する場合には細径管のすくなくとも先

端細管部2及び第1の拡張部aの内壁に官能基を導入しておく必要がある。

通常細径管の少くとも先端細管部の内壁へ第1のレセプタを固定した後、酵素標識体等の非特異的吸着を抑制するためブロッキングが行われる。そのために例えば、牛の血清アルブミン等のアッセイ中の免疫反応に関与しない蛋白質の水溶液を細径管内に導入して所定時間静置する。その後ブロッキング溶液を排出し、細径管を乾燥することにより少くとも細管部に第1のレセプタが固定された細径管が製造される。細径管の乾燥は複数の細径管を連結した状態のままでピペットヘッドをはずし、連結された細径管の内部に乾燥空気を流通させることにより行うことができる。また複数の細径管の連結をほどこし、各細径管をバラバラにした状態で所定温度・所定湿度下に静置することによっても行うことができる。細径管の良好な保存安定性を確保するために、ブロッキング溶液に糖類などを共存させておいてもよい。

（実施例）

第1図に示したような細径管をポリプロピレン樹脂を用いて成型した。細径管の先端細管部の内壁は $560\mu\text{m}$ 、その部分の長さは 8mm である。また細管部と第1の拡張部の内容積の和は $6.5\mu\text{L}$ である。

上記細径管の100本を直列に連結し、その開口部末端の細径管にビベツタを挿入した。一方 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗アルファフェトプロテイン抗体を含むリン酸緩衝溶液を調製し、この溶液中に上記直列に連結された細径管の先端を挿入し、 $700\mu\text{L}$ の該溶液を吸引し、 25°C で24時間静置することにより、細管部2及び第1の拡張部aの内壁に抗アルファフェトプロテイン抗体を吸着させた。次に該抗体溶液をビベツタで排出し、リン酸緩衝溶液(pH 7.0) $700\mu\text{L}$ の吸引、排出を5回繰り返すことにより、細径管内を洗浄した。次いで1%の牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝溶液 $700\mu\text{L}$ を吸引して 25°C で3時間静置することによりブロッキング処理を行った。この溶液を排出した後、ビベツタを取りはずし、乾燥した窒素ガスを直列に連結された細径管内にゆるやかに流通させて細径管を乾

燥させた。

このようにして作成された100本の細径管を用いて、以下のようにしてアルファフェトプロテインのサンドイッチアッセイを行い、100本の細径管の性能のバラつきを測定した。すなわち $50\text{ng}/\text{mL}$ のアルファフェトプロテインと $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のウレアーゼ標識抗アルファフェトプロテイン抗体および10%ヒト血清を含むリン酸緩衝溶液を調製し、該溶液 $20\mu\text{L}$ を上記各細径管中に吸引し、 37°C で10分間インキュベーションした。その後細径管を、 100mM の塩化アンモニウムと 150mM の塩化ナトリウムを含む水溶液で、5回の吸引・排出处理することにより洗浄した。

この処理の後、細径管の先端細管部内壁に残存するウレアーゼの活性を、第4図に示す装置を用いて測定した。基質溶液としては、 100mM の尿素と 100mM の塩化アンモニウムおよび 150mM の塩化ナトリウムを含む水溶液を用いた。

ウレアーゼ活性の指標としては、pH感応電界効果トランジスタのソース電位の変化速度の最大値

(ピークレート)を用いた。

100本の細径管についてその値の最大・最小値、平均値はそれぞれ $1.83\text{mV}/\text{sec}$ 、 $1.65\text{mV}/\text{sec}$ 、 $1.74\text{mV}/\text{sec}$ でその中心変動値(CV値)はわずか1.88%であった。

(発明の効果)

以上に述べた本発明のレセプタが固定された細径管およびその製造方法は次のような優れた効果を有する。

(1)大量の均質な細径管を一度に製造することができる。(2)使用する測定対象物質たるアナライトと特異的に結合する第1のレセプタが極めて少量ですむ。通常細径管の先端細管部2と第1の拡張部aの容積すなわち1つの細径管あたりの第1のレセプタの使用量は数 μL であり、これは従来よく用いられているマイクロプレートの1ウエルあたりの使用量(通常 $100\mu\text{L}$ 前後)の十分の1以下である。(3)第1のレセプタ(抗原や抗体など)は高価であり、その使用量は細径管のコストを決める重要な因子であるのが、本発明の細径管は第

1のレセプタの使用量が極めて少ないため安価である。

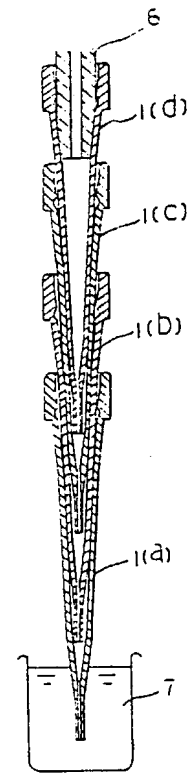
4. 図面の簡単な説明

第1図及び第2図は本発明の第1のレセプタが固定された細径管の断面図であり、第3図は複数の細径管を直列に連結した状態を示す断面図であり、第4図は本発明の細径管を使用した微量アナライト物質の測定装置の模式図であり、第5図は細径管をセル内に挿入した状態を示す断面図である。

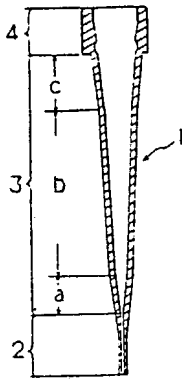
- | | |
|---------------|---------------|
| 1 ... 細径管 | 2 ... 細管部 |
| 3 ... 拡張部 | 4 ... ヘッド |
| 5 ... 第1のレセプタ | 6 ... ビベツタヘッド |
| a ... 第1の拡張部 | b ... 第2の拡張部 |
| c ... 第3の拡張部 | |

特許出願人 株式会社 クラレ
代理人 弁理士 本多 堅

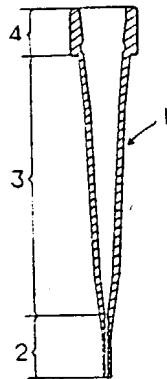
第 3 図



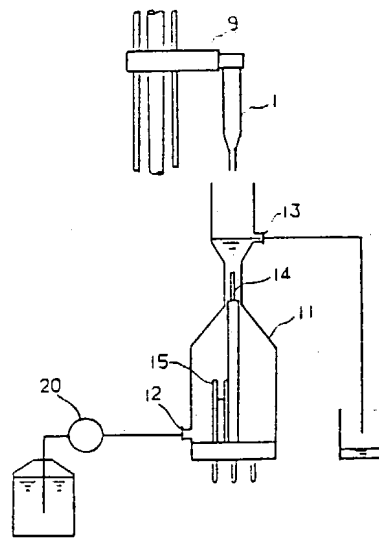
第 1 図



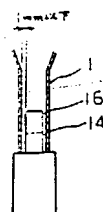
第 2 図



第 4 図



第 5 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.